

РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ НА СЕРУМНА МЕД, СЕЛЕН, РУБИДИЙ, ЦИНК И МАГНЕЗИЙ, С ОЦЕНКА НА ВЛИЯНИЕТО НА ВЪЗРАСТТА, ПОЛА И ФИЗИЧЕСКАТА АКТИВНОСТ

Д. Давчева^{1, 2, 3}, Г. Кирова⁴, Д. Терзиева^{5, 6}, К. Симитчиев⁷

¹Катедра „Клинична лаборатория“, Медицински факултет, ²Научноизследователски институт, Медицински университет – Пловдив, ³Клинична лаборатория, УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив

⁴Катедра „Химични науки“, Фармацевтичен факултет, Медицински университет – Пловдив

⁵Медицински университет – Пловдив, ⁶УМБАЛ „Св. Пантелеймон“ – Пловдив

⁷Катедра по аналитична химия и компютърна химия, Химически факултет, Университет „Паисий Хилендарски“ – Пловдив

REFERENCE INTERVALS OF SERUM COPPER, SELENIUM, RUBIDIUM, ZINC, AND MAGNESIUM WITH EVALUATION OF THE INFLUENCE OF AGE, SEX, AND PHYSICAL ACTIVITY

D. Davcheva^{1, 2, 3}, G. Kirova⁴, D. Terzieva^{5, 6}, K. Simitchiev⁷

¹Department of Clinical Laboratory, Faculty of Medicine, ²Research Institute, Medical University – Plovdiv

³Clinical Laboratory, UMHAT “Sv. Georgi” – Plovdiv

⁴Department of Chemical Sciences, Faculty of Pharmacy, Medical University – Plovdiv

⁵Medical University – Plovdiv, ⁶UMHAT “Sv. Panteleymon” – Plovdiv

⁷Department of Analytical Chemistry and Computer Chemistry, Faculty of Chemistry, University “Paisiy Hilendarski” – Plovdiv

Резюме. Факторите на околната среда, бита и генома определят значимата вариабилност на микроелементния статус при популационни групи от различни географски региони. Това подчертава необходимостта от разработване на надеждни регионално специфични референтни интервали (РИ). Понастоящем липсват данни за РИ на елемента рубидий (Rb), както и за верифицирани с метода масспектрометрия с индуктивно свързана плазма (ICP-MS) РИ на мед (Cu), цинк (Zn), селен (Se) и магнезий (Mg) при лица от българска националност. Цел на настоящото проучване е да се установят популационни РИ за Cu, Zn, Se, Rb и Mg и да се оцени влиянието на факторите възраст, пол и физическа активност. **Материал и методи:** РИ са определени съгласно насоките на Института за клинични и лабораторни стандарти CLSI EP28-A3c. В проучването е включена референтна група от 120 директно подбрани здрави доброволци от българска националност (60 мъже и 60 жени на възраст от 18 до 65 години). Участниците са разделени в три групи: ниска ($n = 29$); средна (< 2 часа/седмица, $n = 31$) и висока (> 2 часа/седмица, $n = 60$) физическа активност. Серумните нива на Cu, Zn, Se, Rb и Mg са определени чрез ICP-MS. **Резултати:** Определени са следните РИ: Mg: 0.65-0.99 mmol/L; Zn: 9.7-16.5 $\mu\text{mol/L}$; Se: 0.69-1.41 $\mu\text{mol/L}$ и Rb: 1.71-3.89 $\mu\text{mol/L}$. Констатиран са статистически значими разлики за Cu между мъже (10.7-19.2 $\mu\text{mol/L}$) и жени: (8.9-24.1 $\mu\text{mol/L}$), $p = 0.003$, както и между жени под и над 30-годишна възраст ($p = 0.001$). Установени са субоптимална концентрация на Se при 43% от референтната група, както и цинков дефицит при 22% от мъжете и 10% от жените. **Заключения:** В това проучване за пръв път са верифицирани РИ на Cu, Zn, Se и Mg в серум с метода ICP-MS и е установен РИ на Rb в серум за българската популация. Оценено е влиянието на факторите пол, възраст и физическа активност върху концентрациите на изследваните елементи.

Ключови думи: референтни интервали, масспектрометрия с индуктивно свързана плазма, минерали, микроелементи, серум

Адрес за кореспонденция: Д-р Деляна Давчева, дм, e-mail: delyana.davcheva@mu-plovdiv.bg

Д. Давчева – ORCID: 0000-0002-5957-1647; Г. Кирова – ORCID: 0000-0002-2554-5424;

К. Симитчиев – ORCID: 0000-0003-2564-3291

Abstract. Environmental, lifestyle, and genomic factors contribute to the significant variability in trace element status among population groups from different geographical regions. This highlights the need to develop reliable regionally specific reference intervals (RIs). Currently, there is a lack of data on the RI of the element rubidium (Rb), as well as on inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) verified RIs of copper (Cu), zinc (Zn), selenium (Se), and magnesium (Mg) in individuals of Bulgarian nationality. The present study aimed to establish population RIs for Cu, Zn, Se, Rb, and Mg, and to assess the influence age, gender, and physical activity. **Materials and Methods:** RIs were determined according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI EP28-A3c. The study included a reference group of 120 directly selected healthy volunteers of Bulgarian nationality (60 men and 60 women aged 18 to 65 years). Participants were divided into three groups: low ($n = 29$), medium (< 2 hours/week, $n = 31$), and high (> 2 hours/week, $n = 60$) physical activity. Serum levels of Cu, Zn, Se, Rb, and Mg were determined by ICP-MS. **Results:** The following RIs were determined: Mg: 0.65-0.99 mmol/L; Zn: 9.7-16.5 $\mu\text{mol/L}$; Se: 0.69-1.41 $\mu\text{mol/L}$, and Rb: 1.71-3.89 $\mu\text{mol/L}$. Statistically significant differences were found for Cu between men (10.7-19.2 $\mu\text{mol/L}$) and women (8.9-24.1 $\mu\text{mol/L}$), $p = 0.003$, as well as between women under and over 30 years of age ($p = 0.001$). Suboptimal Se concentration was found in 43% of the reference group, as well as zinc deficiency in 22% of men, and 10% of women. **Conclusions:** In this study, for the first time, RIs of Cu, Zn, Se, and Mg were verified by ICP-MS, and the RI of Rb was established for the Bulgarian population, with evaluation of the influence of gender, age, and physical activity.

Key words: reference intervals, inductively coupled plasma mass spectrometry, minerals, trace elements, serum

Address for correspondence: Delyana Davcheva, MD, PhD, e-mail: delyana.davcheva@mu-plovdiv.bg

Наличието на надеждни референтни интервали (РИ) е основна предпоставка за адекватната интерпретация на клиничнолабораторните резултати и използването им за диагноза, профилактика и лечение. Независимо от безспорната полза от прилагането на хармонизирани РИ за повечето клиничнохимични показатели, следва да се вземат предвид някои ограничения в тази насока относно есенциалните микроелементи. Влиянието на специфични локални фактори на околната среда, бита и генома определя голямата вариабилност на микроелементния статус в различни географски региони. Фактори като съдържанието на елементи в почвите и водите, начина на живот, пола и възрастта, някои ензимни и хормонални фактори са от решаващо значение за йономния статус.

Отдавна е изяснено значението на есенциалните елементи мед (Cu), цинк (Zn), селен (Se) и магнезий (Mg) за човешкото здраве. Cu, Zn и Se са кофактори на някои от основните антиоксидантни ензими, Cu/Zn супероксид дисмутаза (Cu/Zn SOD) и глутатион пероксидаза (GPx) [1, 2]. Zn-съдържащите ензими контролират клетъчната репликация, целостта на мембраните, костобразуването, растежа, половото съзряване и развитието на плода [2]. Голяма част от селенопротеините (GPx1, GPx2, GPx4) са ензими от ключово значение за антиоксидантната и антивирусната защита на организма, както и за поддържането на целостта на мембраните в стомашно-чревния тракт и на мъжкия фертилитет [1, 3]. Se-зависимите йодотиронин дейодинази (Dio1, Dio2) са ензими с ключова роля в интратиреоидния йоден метаболизъм [3]. Оптималната хомеостаза на Cu е определяща за имунната и антиоксидантната защита на организма, метаболизма на желязото, невротрансмисията, енергийната метаболитна система, еритропоезата, развитието на скелета и синтеза на меланин [1, 2]. Mg е основен кофактор на повече от 300 ензима, участващи в гликолитичната верига и трансклетъчния йонен транспорт, мускулната контракция и оксидативното фосфорилиране. Той е важен за антиоксидантната и имунната защита, синтеза на РНК и ДНК, клетъчния енергиен метаболизъм и невромускулната възбудимост [4]. Клиничното значение на нарушената хомеостаза на Cu, Zn, Se и Mg определя целесъобразността на мултиелементния анализ при патологични състояния, базирани на процеси като оксидативен стрес и възпаление.

Rb е сред микроелементите с ненапълно изяснено биологично и клинично значение. Известно е, че по отношение на участието си във физиологичните процеси той наподобява поведението на калий (K) и цезий и е тясно свързан с метаболизма на K [5]. В синапсите на централната нервна система Rb повишава нивата на невротрансмитерите допамин и норепинефрин и проявява серотониноподобни ефекти [5]. Въпреки че интересът към елемента Rb нараства през последните години, все още има оскъдни данни в научната литература, включително за здрави популационни групи.

РИ на Cu, Zn, Se и Mg в серум (sCu, sZn, sSe, sMg) са определени за българската популация през 1987 г. с метода атомноабсорбционна спектрометрия (AAS) [6]. РИ на sCu и sZn са актуализирани през 2014 г., а за sSe при деца през 2006 г. с метода AAS [7, 8]. Понастоящем няма данни за РИ на Rb в серум (sRb), както

и за РИ за sCu, sZn, sSe, sMg, верифицирани с метода масспектрометрия с индуктивно свързана плазма (ICP-MS), за българската популация. Тези аргументи подчертават необходимостта от разработване на регионално специфични РИ.

Цел на настоящото проспективно проучване е определяне на РИ на елементите Cu, Zn, Se, Rb и Mg в серум от венозна кръв, чрез ICP-MS, за българска популация, и проучване на влиянието на факторите възраст, пол и физическа активност върху концентрациите на изследваните елементи.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Референтна група

РИ са установени съгласно препоръките на Института за клинични и лабораторни стандарти (CLSI EP28-A3c), предлагащи подробен протокол за определяне на РИ, който отговаря на минималните изисквания за надеждност и пригодност [9]. Проучването е проведено в периода от 2017 до 2019 г. и включва референтна група от 120 директно подбрани здрави доброволци от българска националност, на възраст от 18 до 65 години, с равни по възраст и пол подгрупи, от област Пловдив, България.

Критериите за включване са съобразени с общоприетите препоръки на CLSI [9]. Контролът на клиничното състояние на участниците в референтната група е осъществен в Клинична лаборатория на УМБАЛ „Свети Георги“ – Пловдив, чрез анамнеза и рутинни клиничнолабораторни кръвни изследвания (пълна кръвна картина, диференциална кръвна картина, скорост на утаяване на еритроцитите, глюкоза, урея, креатинин, пикочна киселина, C-реактивен протеин, общ серумен протеин, албумин, аланин аминотрансфераза, аспартат аминотрансфераза, общ холестерол, триглицериди, HDL холестерол, LDL холестерол, натрий, калий, хлориди и калций). Участниците в проучването бяха класифицирани в три групи, на базата на попълнена от тях анкетна карта с информация за седмичната им физическа активност, а именно: 1) ниска физическа активност – без активно физическо натоварване ($n = 29$); 2) средна физическа активност – активно физическо натоварване до 2 часа седмично ($n = 31$), и 3) висока физическа активност – активно физическо натоварване повече от 2 часа седмично ($n = 60$).

Определени бяха следните критерии за изключване: остри възпалителни заболявания през предходните 30 дни, анемия, хронични заболявания, затлъстяване, злоупотреба с алкохол, тютюнопушене, наркомания, професионални рискове, токсична експозиция, нощен труд, прием на лекарства, прием на хранителни добавки, съдържащи Se, Zn, Cu, Rb и Mg, през предходните 6 месеца, нарушен глюкозен толеранс, бременност и кърмене, хирургична интервенция до 3 месеца преди вземане на кръв, тежки наранявания, тежък физически и психичен стрес.

Вземането на кръвни проби е извършено на гладно, съгласно стандартната процедура за събиране на кръвни проби. Серумните проби са отделени и съхранявани при -70°C до анализа. Всички лабораторни съдове, използвани за вземане на кръвни проби, съхранение и анализ, са предварително тествани за контаминация с елементите от интерес.

Проучването е проведено в съответствие с Декларацията от Хелзинки и е одобрено от Комисията по научна етика на Медицински университет – Пловдив (протокол № 3/08.06.2017). Получено е писмено информирано съгласие от всички участници в проучването.

Реактиви и инструментални методи

Определянето на sCu, sZn, sSe, sRb и sMg е извършено чрез ICP-MS (iCAP Qc, Thermo Fisher Scientific, Бремен, Германия) в Научноизследователска лаборатория „Елементарен анализ“ към Научноизследователския институт на Медицински университет – Пловдив. Преди измерването е приложена оптимизирана процедура за микровълново подпомогната киселинна минерализация на серумните проби чрез микровълнова система със затворени съдове (Multiwave GO, Anton Paar, Австрия). Всички елементни стандарти, използвани за приготвяне на калибрационни стандартни разтвори, са сертифицирани, с проследимост до NIST стандарти: Etalon multi-element ICP, 100 mg/L (VWR Chemicals, Льовен, Белгия); ICP-MS monoelement Zn 100 mg/L, Cu 100 mg/L (CPAchem Ltd., Стара Загора, България); шесткомпонентен CRM с концентрации: Mg 60 mg/L, P 100 mg/L, Ca 300 mg/L, K 500 mg/L, Na 10 000 mg/L (CPAchem Ltd., Стара Загора, България); NaCl, 10 161 mg/L (CPAchem Ltd., Стара Загора, България); родий, 10 mg/L (Merck, Дармщат, Германия). Вътрелaborаторният контрол на качеството е проведен със сертифицирани референтни материали от човешки серум в две нива (Seronorm Trace Elements L1, L2, SERO AS, Норвегия). Лабораторията участва в международна система за външна оценка на качеството за изследваните елементи. Процедурата за микровълнова минерализация, методът за псевдоматриксимитирана калибрация, както и инструменталните условия на работа на ICP-MS са описани подробно в предишно наше проучване [10].

Статистически методи

За статистически анализ на данните са използвани софтуерните продукти IBM SPSS Statistics 19 и Microsoft Office Excel 2010. Нивото на статистическа значимост е определено на $p < 0,05$. В случай на нормално разпределени стойности за дескриптивен анализ са използвани средната стойност и стандартното отклонение (SD). При отклонение от нормалното разпределение са използвани медиана и диапазонът 10-и-90-и персентил. Видът на статистическото разпределение на изследваните концентрации е оценен чрез графичен анализ (хистограми, боксплот диаграми), формални статистически тестове (Колмогоров-Смирнов и Шапиро-Уилк) и анализ на определените коефициенти на асиметрия и ексцес. Наличието на „бегълци“ е установено чрез графичен анализ на построените боксплот диаграми и критерий 1.5 IQR (интерквартилен диапазон).

За определяне на РИ на изследваните химични елементи с гаусово разпределение на концентрациите е приложен параметричен метод (средна стойност $\pm 1,96$ SD). Извършено е допълнително изчисляване на 90% доверителен интервал (ДИ) на долната и горната референтна граница. В случай на отклонение от нормалното разпределение са приложени два различни подхода: използване на параметричен метод

(средна стойност $\pm 1,96$ SD), след трансформация на данните с помощта на десетичен логаритъм, или определяне на персентилния интервал 2,5-97,5.

За оценка на влиянието на възрастта, пола и физическата активност върху концентрациите на анализирани елементи бяха приложени Т-тест за независими извадки (за две сравнявани групи) и дисперсионен анализ (ANOVA) (за повече от две сравнявани групи), в случай на гаусово разпределени величини. В случаите, когато концентрациите на химичните елементи се отклоняваха от нормалното разпределение и/или беше съобщено за наличие на „бегълци“, бяха приложени непараметрични тестове, съответно Mann-Whitney и Kruskal-Wallis с Dunn post hoc анализ. Влиянието на възрастта на участниците върху нивата на sMg, sZn, sCu, sSe, sRb също беше оценено чрез изчисляване на коефициента на корелация Kendall's tau-b.

РЕЗУЛТАТИ

Оценка на влиянието на факторите пол, възраст и физическа активност

В нашето проучване е установена статистически значима разлика между групите на мъжете и жените само за sCu. Резултатите от измерените sMg, sCu, sZn, sSe и sRb в общата, мъжката и женската група са представени в табл. 1.

Таблица 1. Серумни концентрации на Mg, Cu, Zn, Se и Rb в общата група и в групите на мъжете и жените, представени като медиана и персентилен интервал [P2.5, P97.5]

Елемент	Обща група (n = 120)		Мъже (n = 60)		Жени (n = 60)		p-стойност
	Med	[P2.5, P97.5]	Med	[P2.5, P97.5]	Med	[P2.5, P97.5]	
Mg mmol/L	0.82	[0.69, 0.96]	0.83	[0.69, 0.96]	0.82	[0.68, 1.02]	$p = 0.789^1$
Cu μ mol/L	15.4	[11.9, 23.0]	15.0	[11.8, 18.9]	16.2	[11.4, 25.1]	$p = 0.003^1$
Zn μ mol/L	12.5	[9.93, 16.86]	13.2	[9.4, 17.2]	12.4	[10.0, 17.0]	$p = 0.052^2$
Se μ mol/L	1.04	[0.79, 1.48]	1.05	[0.77, 1.44]	1.03	[0.76, 1.84]	$p = 0.298^1$
Rb μ mol/L	2.40	[1.85, 3.35]	2.40	[1.77, 3.06]	2.44	[1.86, 3.90]	$p = 0.315^2$

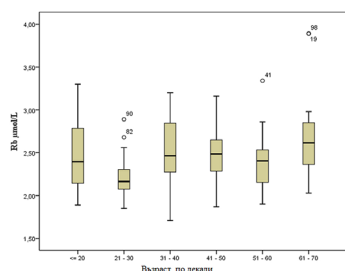
¹Приложен е Т-тестът за независими извадки. ²Приложен е тестът на Ман-Уитни.

За да се оцени влиянието на възрастта върху концентрациите на изследваните елементи, беше оценено разпределението на техните стойности в отделните възрастови групи по декади и по възрастови интервали от 20 години. Тъй като беше установено, че полът не влияе върху концентрациите на Mg, Zn, Se и Rb, беше извършен статистически анализ, включващ цялата референтна група и за четирите елемента. Поради доказаните статистически значими разлики, свързани с пола, за sCu анализирани групи бяха допълнително стратифицирани по пол.

Статистическият анализ на влиянието на възрастта върху концентрацията на Mg показва следното: 1) тест на Крускал-Уолис: $p = 0,163$ и 2) Kendall's tau-b: $p = 0,031$. Графичният анализ на боксплот диаграмите установи много близки стойности на медианите на концентрациите на Mg в отделните възрастови групи, вариращи от 0.78 до 0.86 mmol/L. Поради тази причина заключихме,

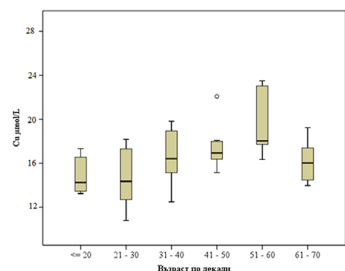
че няма ясна тенденция на връзка между концентрацията на Mg и възрастта на референтните индивиди.

Резултатите за sZn и sSe не показаха влияние на възрастта върху концентрациите на елементите ($p > 0,05$). Р-стойностите от статистическия анализ на влиянието на възрастта върху концентрацията на Rb бяха много близки до граничното ниво на значимост ($p \sim 0,04$, тест на Крускал-Уолис, Kendall's tau-b). Извършен е допълнителен графичен анализ с боксплот диаграми по декади. Резултатите показаха много близки стойности за всички пациенти, вариращи от 1.71 до 3.30 $\mu\text{mol/L}$, с изключение на един „беглец“ с sRb от 3.90 $\mu\text{mol/L}$ (фиг. 1). Беше направено заключение, че няма клинично значима връзка между концентрацията на Rb и възрастта на референтните индивиди.



Фиг. 1. Диаграми тип „кутия“ и „мустаци“, илюстриращи разпределението на концентрациите на sRb по декади. Кутия – интерквартилен диапазон; линия – медиана; мустаци – максимални и минимални стойности

За да се оцени влиянието на възрастта върху нивата на sCu, референтната група беше стратифицирана по пол по декади, поради гореспоменатите разлики, свързани с пола. Установено е, че възрастта няма статистически значим ефект върху концентрацията на Cu при мъжете ($p > 0,05$). Въпреки това беше демонстрирана статистически значима разлика ($p = 0,001$) между концентрацията на Cu при жени от различни възрастови групи. Най-високите концентрации са измерени при жени на възраст от 51 до 60 години (фиг. 2). Чрез прилагане на графичен анализ и параметричен ANOVA тест с post hoc анализ бяха направени множество сравнения на средноаритметичните стойности между отделните групи. Резултатите показаха значителна разлика ($p < 0,05$) между концентрациите на Cu при жени под 30-годишна възраст спрямо жени над 30-годишна възраст.



Фиг. 2. Диаграми тип „кутия“ и „мустаци“, илюстриращи разпределението на концентрациите на sCu при жени, стратифицирани по възраст. Кутия – диапазон; линия – средноаритметична стойност; „мустаци“ – максимални и минимални стойности

Влиянието на физическата активност върху нивото на елементите Cu, Zn, Se, Mg и Rb беше оценено за цялата референтна група. Поради значителното влияние на факторите пол и възраст върху нивото на sCu референтната група беше допълнително стратифицирана по пол и възраст за този елемент. Сравнението по двойки на трите групи не показва статистически значимо влияние на физическата активност върху нивата на изследваните елементи ($p > 0,05$).

Референтни граници

Тъй като предварителният статистически анализ установи, че факторите пол и възраст нямат статистически значимо влияние върху концентрациите на sMg, sZn, sRb и sSe, определихме общи референтни граници на тези елементи за цялата референтна група (табл. 2). Анализът на sCu показва статистически значима разлика между двата пола, както и между възрастовите групи до 30 години и над 30 години при жените. На базата на получените данни бяха определени отделни референтни граници на sCu за мъже (18-65 години) и жени над 30 години (табл. 2). Поради недостатъчния брой в подгрупата жени до 30 години ($n = 20$) е представен концентрационният интервал на получените резултати (табл. 2). Въз основа на получените данни за оценка на разпределението е приложен параметричен метод (средна стойност ± 1.96 SD) за изчисляване на референтните граници за следните елементи: Mg и Se, Cu за мъжете и Cu за групата жени до 30 години (95% CI). Поради отклонение от нормалното разпределение за елемента Zn беше извършена предварителна трансформация на данните чрез използване на операция на десетичен логаритъм. След нормализиране на разпределението гореспоменатият параметричен метод беше приложен за определяне на РИ. Същият подход беше приложен за sCu от жени във възрастовия интервал от 31 до 65 години. За концентрациите на Rb беше установено отклонение от нормалното статистическо разпределение и наличие на „бегълци“, поради което РИ бяха определени чрез изчисляване на интервала 2,5-97,5 персентил. За всички елементи беше извършено допълнително изчисляване на 90% доверителен интервал на долната и горната референтна граница.

Таблица 2. Серумни концентрации на Mg, Cu, Zn, Se и Rb, представени като медиана и интервал [P2.5, P97.5], и изчислени РИ

Елемент	Група	Медиана [P2.5, P97.5]	Изчислен РИ
Mg mmol/L	Общо	0.82 [0.69, 0.96]	0.65-0.99
Zn $\mu\text{mol/L}$	Общо	12.5 [9.93, 16.9]	9.7-16.5
Se $\mu\text{mol/L}$	Общо	1.04 [0.79, 1.48]	0.69-1.41
Rb $\mu\text{mol/L}$	Общо	2.40 [1.85, 3.35]	1.71-3.89
Cu $\mu\text{mol/L}$	Мъже	15.0 [11.8, 18.9]	10.7-19.2
Cu $\mu\text{mol/L}$	Жени < 30 г.	14.0 [10.6, 17.9] ¹	–
Cu $\mu\text{mol/L}$	Жени > 30 г.	17.4 [12.3, 23.0]	11.9-24.1

¹Медиана [Min, Max].

ОБСЪЖДАНЕ

РИ на Cu, Se и Zn от настоящото проучване бяха сравнени с литературни данни от представителни извадки на здрави индивиди в проучвания, проведени в 15 страни след 2005 г. (табл. 3). Определените от нас РИ са близки до отчетените стойности при здрави българи в предишни проучвания и попадат в интервала от стойности, обобщени в други европейски проучвания.

Трябва да се отбележи обаче, че 43% от участниците в нашето проучване са с концентрация на Se под прага от 1.01 $\mu\text{mol/L}$, определящ оптималната експресия на глутатион пероксидаза (GPx) и селенопротеин Р. Нашите данни отдаваме на факта, че България, както

повечето европейски страни, е сред районите с дефицит на Se на световния селенов атлас [24]. В нашето проучване не открихме значително влияние на възрастта и пола върху концентрациите на sSe, което потвърждава резултатите от предишни проучвания [2, 18, 25]. Въпреки това някои автори съобщават за по-високи концентрации на sSe при мъже [18, 25]. Предполага се, че по-голямата мускулна маса при мъжете е причината за разликата, свързана с пола. Чен и сътр. наблюдават статистически значима тенденция за намаляване на концентрациите на Se след 40-годишна възраст в мащабно проучване (n = 2755), предполагайки, че отрицателната корелация между възрастта и нивата на Se се дължи на специфичната промяна в хранителните навици по религиозни причини [26].

Таблица 3. Сравнение на sCu, sSe и sZn ($\mu\text{g/L}$)* при здрави индивиди от различни страни

Проучване	n (М/Ж)	Възраст (години)	Метод	Cu	Se	Zn
Текущо проучване, 2017–2019	120 (60/60)	18–65	ICP-MS	566–1533	55–112	634–1079
България, 1987 [6]	345		AAS/ETAAS	681–1736	32–91	693–1242
България, 2006 [8]	143	6–10	ETAAS	-	36–102	-
България, 2013–2015 [7]	379 (172/207)	12–95	AAS	630–1584	-	765–960
Англия, 2005 [2]	189 (94/95)	20–70+	AAS	898–1158	77–83	838–936
Италия, Белгия, Англия, 2012 [11]	1609 (748/861)	27–63	AAS/ETAAS	547–1896	59–135	595–1092
Иран, 2012 [12]	2632 (1920/712)	20–94	AAS	-	-	608–2013
Дания, 2013 [3]	830 (155/675)	18–65	F	-	59–138	-
Швеция, 2014 [13]	1000 (498/502)	70	SFMS	589–1332	-	503–961
САЩ, 2015 [14]	2287 (1107/1180)	12–80+	ICP-MS	-	120–693	-
Бразилия, 2016 [15]	240 (175/65)	18–74	ICP-MS	736–2801	-	600–1228
Китай, 2016 [16]	1327 (446/881)	40–70	ICP-MS	520–1540	100–300	550–1300
Испания, 2016 [17]	372 (60/312)	20–70	ETAAS	-	56–103	-
Корея, 2017 [18]	258 (119/139)	12–78	ICP-MS	678–1545	79–167	555–1287
Сърбия, 2019 [19]	295 (146/149)	38–42	ICP-MS	434–1042	41–98	387–839
Русия, 2020 [20]	107 (35/72)	34–60	ICP-MS	1004–1922	-	678–1686
САЩ, 2020 [21]	6683 (3289/3394)	8–80	ICP-MS	247–3066	58–299	314–2325
Германия, 2021 [22]	2087	35–64	ICP-MS/MS	688–1354	61–99	543–913
Румъния, 2021 [23]	1264 (1053/211)	16–89	ICP-MS	-	64–137	-

М – мъже; Ж – жени; SPM, спектрофотометрия; SFMS – секторна полева маспектрометрия; F – флуориметрия; ICP-MS/MS – тандем маспектрометрия с индуктивно свързана плазма. *Формула за преобразуване: $\mu\text{mol/L} = \mu\text{g/L}/\text{molecular weight}$ (Cu: 63.55 g/mol; Zn: 65.38 g/mol; Se: 78.97 g/mol).

Нашите заключения относно статистически значимите разлики при sCu, свързани с пола, потвърждават резултатите от предишни проучвания [2, 7, 11, 15, 18, 25]. Някои от тях показват до два пъти по-високи стойности на sCu при жени, най-вероятно от естроген-индуцирания синтез на церулоплазмин в черния дроб. Това е свързано с по-високи серумни нива на церулоплазмин и повишена абсорбция на Cu при жени на възраст 20–60 години. По отношение на възрастта открихме положителна корелация с sCu само в групата на жените. Нашите заключения потвърждават резултатите, публикувани от други автори [2, 7]. Съществуват обаче и проучвания, в които не е установено статистически значимо влияние на възрастта върху нивата на sCu [18, 23]. Тези несъответствия могат да бъдат свързани със специфичното влияние на местните географски фактори.

sZn е надежден лабораторен биомаркер както за диагностициране на тежки цинкови дефицити, така и за мониториране на приема на добавки, съдържащи цинк. Препоръчителните ориентировъчни стойности за sZn са определени, както следва: 10.7 $\mu\text{mol/L}$ за жени на възраст ≥ 10 години и 11.3 $\mu\text{mol/L}$ за мъже на възраст ≥ 10 години [27]. Според тези препоръки 22% от нашите референтни индивиди в групата на мъжете и 10% от групата на жените отговарят на критериите за дефицит, но имат нива, близки до граничните стойности. Що се отнася до влиянието на пола и възрастта върху sZn, не открихме статистически значими разлики, свързани с пола и възрастта. Нашите резултати са в съответствие с тези от предишни проучвания [7, 2, 11, 15, 18, 25]. В научната литература обаче има противоречиви данни, вероятно поради влиянието на географски фактори и специфични хранителни навици. Публикувани са по-високи стойности на Zn при мъже в сравнение с жени от Великобритания и Сърбия, докато в проучване в Русия са установени по-високи нива при жените [2, 19, 20]. Някои изследвания откриват отрицателна корелация между възрастта и концентрацията на Zn [15]. Възможно обяснение за тези наблюдения е свързаното с възрастта намаляване на чревната абсорбция на някои микроелементи, включително Zn.

Според данните от нашето проучване факторите пол, възраст и физическа активност нямат статистически значимо влияние върху sRb. С този аргумент определихме общ РИ на sRb за мъже и жени на възраст 18–65 години (1.71–3.88 $\mu\text{mol/L}$). Малкото публикувани проучвания отчитат сходни нива за здрави индивиди [11, 20]. Относително по-високи стойности са публикувани за групи от населението, обитаващи региони в Северна Русия [20]. За разлика от нашите данни, Sivtseva et al. откриват статистически значимо ($p = 0,005$) по-висок sRb при мъже, отколкото при жени [20].

РИ на Mg е близък до хармонизирания референтни стойности, използвани в практиката, както и до отчетения РИ за българска популация през 1987 г. [6]. Според нашето проучване факторите пол, възраст и физическа активност нямат статистически значимо влияние върху sMg, което е в съответствие с цитираните по-горе проучвания. Въпреки променливите РИ, посочени в литературата, използването на хармонизиран РИ за общ sMg (0.70–1.10 mmol/L) е допустимо, независимо от използвания аналитичен метод.

Що се отнася до влиянието на физическата активност върху концентрацията на Mg, Cu, Zn и Se, не открихме статистически значима разлика между групите с ниска, средна и висока физическа активност. Трябва обаче да се има предвид, че в група 3 (трениращи спорт повече от 2 часа седмично) бяха включени непрофесионални спортисти. За разлика от нашия подход, Maunag et al. съобщават данни от сравнителен анализ на sCu, sZn и sSe при професионални спортисти и индивиди със заседнал начин на живот. Те отчитат отрицателна корелация на интензивното аеробно натоварване със серумните и уринните концентрации на трите елемента [28]. В условия на сравним хранителен прием, изчерпването на Cu, Zn и Se, установено в тези проучвания, е логично свързано с повишени клетъчни метаболитни нужди от трите елемента поради индуцирания оксидативен стрес. Тази динамика е свързана с адаптивен отговор чрез повишен капацитет на защитните вътреклетъчни и извънклетъчни антиоксидантни механизми, включително GPx, Cu/Zn-SOD и селенопротеин P [28]. Вероятно няколко допълнителни фактора, като изходна концентрация, вид на физическата активност и специфични генетични фактори, влияят върху степента на изчерпване, както и върху преразпределението на елементите между вътреклетъчното и извънклетъчното пространство. Серумните и еритроцитните концентрации на Mg намаляват по време на тренировка, а добавките с Mg имат защитен ефект срещу мускулни увреждания [4, 29]. Поради повишената нужда от Mg в условия на ускорен метаболизъм физически активните индивиди се нуждаят от допълнителен прием на Mg. Субоптималната концентрация на Mg при лица с повишено физическо натоварване е свързана с намалена ефективност на енергийния метаболизъм и намалена издръжливост. Обратно, оптималният прием на Mg е свързан с по-ниска консумация на кислород и по-добри кардиореспираторни показатели по време на аеробни упражнения [30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В това проучване верифицирахме РИ на sCu, sZn, sSe и sMg за българската популация с метода ICP-MS и установихме РИ на sRb, за които липсват данни до настоящия момент. Важно наблюдение в нашето проучване са установените субоптимална концентрация на sSe при 43% от референтната група, както и цинков дефицит при 22% от мъжете и 10% от жените. Анализът на влиянието на фактора пол върху концентрациите на изследваните елементи установи статистически значима разлика само за Cu, с по-високи нива при жените. По отношение на възраста открихме положителна корелация само с sCu в женската група, с най-високи концентрации при жени на възраст от 51 до 60 години. Не е наблюдавано статистически значимо влияние на физическата активност върху нивата на изследваните елементи.

БИБЛИОГРАФИЯ

- Verma P, K Sharma A, Shankar H, et al. Role of Trace Elements, Oxidative Stress and Immune System: a Triad in Premature Ovarian Failure. *Biol Trace Elem Res*. 2018;184(2):325-333. doi:10.1007/s12011-017-1197-6.
- Ghayour-Mobarhan M, Taylor A, New SA, et al. Determinants of serum copper, zinc and selenium in healthy subjects. *Ann Clin Biochem*. 2005;42(Pt 5):364-375. doi:10.1258/0004563054889990.

- Bülöw Pedersen I, Knudsen N, Carlé A, et al. Serum selenium is low in newly diagnosed Graves' disease: a population-based study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;79(4):584-590. doi:10.1111/cen.12185.
- Córdova A, Mielgo-Ayuso J, Roche E, et al. Impact of Magnesium Supplementation in Muscle Damage of Professional Cyclists Competing in a Stage Race. *Nutrients*. 2019;11(8):1927. Published 2019 Aug 16. doi:10.3390/nu11081927.
- Kordjazy N, Haj-Mirzaian A, Amiri S, et al. Elevated level of nitric oxide mediates the anti-depressant effect of rubidium chloride in mice. *Eur J Pharmacol*. 2015;762:411-418. doi:10.1016/j.ejphar.2015.06.030.
- Tzatchev KN. Reference limits of selenium, zinc, copper, iron and magnesium in blood serum and amniotic fluid and their informative content in some malignant diseases. Thesis for the award of the scientific degree "Candidate of Medical Sciences", Medical University – Sofia, Bulgaria, 1987.
- Ivanova ID, Atanasova BD, Kostadinova AD, et al. Serum copper and zinc in a representative sample of Bulgarian population. *Acta Medica Bulgarica*. 2016; 43, 21-31. https://doi.org/10.1515/amb-2016-0013
- Tzatchev KN, Lozanov BS, Apostolova EH, et al. Reference values for serum selenium of children in the area of Smolyan, Bulgaria. *Acta Medica Bulgarica*. 2006;3:3-6.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline – third edition. CLSI document C28-A3c. Wayne: CLSI; 2008.
- Davcheva DM, Kirova GK, Tsvetkova TZ, et al. Preanalytical sample preparation and calibration optimization for ICP-MS analysis of copper, zinc, selenium, rubidium, strontium, magnesium, iron, molybdenum and barium. *Bulg. Chem. Commun*. 2019;51(D) 52-7.
- Arnaud J, de Lorgeil M, Akbaraly T, et al. Gender differences in copper, zinc and selenium status in diabetic-free metabolic syndrome European population - the IMMIDIET study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012;22(6):517-524. doi:10.1016/j.numecd.2010.09.005
- Ghasemi A, Zahediasl S, Hosseini-Esfahani F, et al. Reference values for serum zinc concentration and prevalence of zinc deficiency in adult Iranian subjects. *Biol Trace Elem Res*. 2012;149(3):307-314. doi:10.1007/s12011-012-9445-2
- Schultze B, Lind PM, Larsson A, et al. Whole blood and serum concentrations of metals in a Swedish population-based sample. *Scand J Clin Lab Invest*. 2014;74(2):143-148. doi:10.3109/00365513.2013.864785
- Christensen K, Werner M, Malecki K. Serum selenium and lipid levels: Associations observed in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2011-2012. *Environ Res*. 2015;140:76-84. doi:10.1016/j.envres.2015.03.020
- Rocha GH, Steinbach C, Munhoz JR, et al. Trace metal levels in serum and urine of a population in southern Brazil. *J Trace Elem Med Biol*. 2016;35:61-65. doi:10.1016/j.jtemb.2015.12.005
- Zhang H, Yan C, Yang Z, et al. Alterations of serum trace elements in patients with type 2 diabetes. *J Trace Elem Med Biol*. 2017;40:91-96. doi:10.1016/j.jtemb.2016.12.017
- González-Estecha M, Palazón-Bru I, Bodas-Pinedo A, et al. Relationship between serum selenium, sociodemographic variables, other trace elements and lipid profile in an adult Spanish population. *J Trace Elem Med Biol*. 2017;43:93-105. doi:10.1016/j.jtemb.2016.12.002
- Kim HJ, Lim HS, Lee KR, et al. Determination of Trace Metal Levels in the General Population of Korea. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14(7):702. doi:10.3390/ijerph14070702
- Stojasavljević A, Jagodić J, Vujotić L, et al. Reference values for trace essential elements in the whole blood and serum samples of the adult Serbian population: significance of selenium deficiency. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2020;27(2):1397-1405. doi:10.1007/s11356-019-06936-8
- Sivtseva AI, Sivtseva EN, Shadrina SS, et al. Microelement composition of serum in Dolgans, indigenous inhabitants of the Russian Arctic, in the conditions of industrial development of territories. *Int J Circumpolar Health*. 2020;79(1):1764304. doi:10.1080/22423982.2020.1764304
- Bastola MM, Locatis C, Maisiak R, et al. Selenium, copper, zinc and hypertension: an analysis of the National Health and Nutrition Examination Survey (2011-2016). *BMC Cardiovasc Disord*. 2020;20(1):45. doi:10.1186/s12872-020-01355-x
- Cabral M, Kuxhaus O, Eichmann F, et al. Trace element profile and incidence of type 2 diabetes, cardiovascular disease and colorectal cancer: results from the EPIC-Potsdam cohort study. *Eur J Nutr*. 2021;60(6):3267-3278. doi:10.1007/s00394-021-02494-3
- Bizerea-Moga TO, Pitulice L, Bizerea-Spiridon O, et al. Evaluation of Serum Selenium Status by Age and Gender: A Retrospective Observational Cohort Study in Western Romania. *Nutrients*. 2021;13(5):1497. doi:10.3390/nu13051497
- Krustev SV, Angelova VR, Zaprianova PS, et al. Selenium content in soil and wheat grain in Bulgaria. *Acta sci. agric*. 2020;4:26-31. https://doi.org/10.31080/asag.2020.04.0888
- Clark NA, Teschke K, Rideout K, et al. Trace element levels in adults from the west coast of Canada and associations with age, gender, diet, activities, and levels of other trace elements. *Chemosphere*. 2007;70(1):155-164. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.06.038
- Chen CJ, Lai JS, Wu CC, et al. Serum selenium in adult Taiwanese. *Sci Total Environ*. 2006;367:448-450. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.03.004
- King JC, Brown KH, Gibson RS, et al. Biomarkers of nutrition for development (BOND) - zinc review. *J Nutr*. 2015;146: 858S-885S. https://doi.org/10.3945/jn.115.220079
- Maynar M, Bartolomé I, Alves J, et al. Influence of a 6-month physical training program on serum and urinary concentrations of trace metals in middle distance elite runners. *J Int Soc Sports Nutr*. 2019;16(1):53. doi:10.1186/s12970-019-0322-7.
- Bohl CH, Volpe SL. Magnesium and exercise. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2002;42:533-563. https://doi.org/10.1080/20024091054247
- Tardy AL, Pouteau E, Marquez D, et al. Vitamins and Minerals for Energy, Fatigue and Cognition: A Narrative Review of the Biochemical and Clinical Evidence. *Nutrients*. 2020;12(1):228. doi:10.3390/nu12102228.